

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHÁLIA ALVES DIAMANTE

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA
ESTUDOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO NO BRASIL**

PARANAVAÍ

2015

NATHALIA ALVES DIAMANTE

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA
ESTUDOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO NO BRASIL**

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do Curso de Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio, na modalidade de Ensino a Distância, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Karin Braun Prado

PARANAVAÍ

2015

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

A UFPR/CIPEAD pela oportunidade de realizar esta especialização;

Ao polo presencial de Paranaíba;

A Professora Tutora Marisa Inês Bilthauer pelo auxílio durante a realização da especialização;

A Tutora Cintia Callegari Coelho pela orientação e auxílio no desenvolvimento das atividades.

E a Prof^a. Dr^a. Karin Braun Prado pela orientação.

RESUMO

O melhoramento genético é responsável pelos avanços na agricultura, e os marcadores moleculares são um instrumento para auxiliar o melhoramento. Os marcadores microssatélites são sequências de DNA repetitivo composto de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos adjacentes dispersos no genoma. Visando analisar a contribuição dos marcadores microssatélites no melhoramento genético e apontar possíveis direções para o desenvolvimento de sua utilização, o objetivo deste trabalho foi verificar os principais organismos estudados por meio de microssatélites e o objetivo de sua utilização em artigos presentes na base de dados do periódico Capes. A estratégia para a busca no banco de dados foi a de utilizar as palavras-chave “Microssatélite” e “melhoramento genético”. O levantamento feito amostrou um número pequeno de trabalhos, mas foi suficiente para constatar um aumento nas publicações de melhoramento genético que empregam marcadores moleculares microssatélites nos últimos anos. Verifica-se, também, que estas publicações incluem artigos, resumos, teses e dissertações, e são em sua maioria sobre melhoramento vegetal. Os marcadores microssatélites foram empregados para uma ampla gama de espécies e com o intuito de atingir vários objetivos, indicando a eficiência e a aplicabilidade desse marcador. Talvez análises futuras considerando bancos de dados internacionais possam revelar uma maior quantidade de trabalhos, principalmente de artigos.

Palavras-chave: DNA nuclear. Genética molecular. Sequências simples repetidas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Quantidade de trabalhos científicos sobre melhoramento genético utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite publicados por ano.....	12
Gráfico 2 – Frequência dos tipos trabalhos encontrados na busca no periódicos capes com as palavras-chave: “Melhoramento genético e “Microssatélite”	12
Gráfico 3 - Frequência dos trabalhos de melhoramento utilizando marcadores microssatélite que estudaram vegetais, animais ou fungos	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies estudadas nos trabalhos de melhoramento de genético utilizando microssatélites e o número trabalhos com essas espécies.....**13**

Tabela 2 - Objetivos propostos pelos trabalhos encontrados na busca no banco de dados periódicos capes com as palavras-chave: “melhoramento genético” e “microssatélite”**15**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA	9
3	OBJETIVOS	10
3.1	Objetivo Geral	10
3.2	Objetivos Específicos	10
4	METODOLOGIA.....	10
5	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	11
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
	REFERENCIAS.....	16

1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura. Marcadores moleculares são um instrumento para auxiliar o melhoramento, pois fornecem uma quantidade ilimitada de polimorfismos com base no DNA e são livres dos efeitos ambientais e do estado fisiológico do organismo, possibilitando a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis. Características essas que não são consideradas no melhoramento clássico baseado apenas em características fenotípicas, (LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000).

Marcador molecular é um seguimento cromossômico que pode ser utilizado para detectar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (BORÉM, 2005). Dentre as principais técnicas de análise genética, o emprego de marcadores moleculares tem exercido um papel representativo nos últimos anos. Essas ferramentas têm sido constantemente utilizadas para a resolução de problemas taxonômicos, no melhoramento genético de espécies, nos estudos de variações do genoma, na análise filogenética e evolutiva, na verificação de polimorfismos nas populações entre outros (GASQUES; BELONI; OLIVEIRA, 2013).

Na análise de ácidos nucleicos, os marcadores moleculares mais utilizados são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), os STS (*Sequence Tagged Site*), os minissatélites, os microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com primers específicos, ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), QTL (*Quantitative Trait Locus*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (BOREM; CAIXETA, 2006; BUSO, 2005).

Os marcadores microsatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são sequências de DNA repetitivo composto de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos adjacentes dispersos no genoma de vertebrados, insetos e plantas (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; SCHLÖTTERER; PEMBERTON, 1998) e estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (FERGUSON *et al.*, 1995; MILACH, 1998; MATIOLI, 2001). O seu polimorfismo está baseado na variação do número dos elementos repetidos, possivelmente causado por falhas da DNA polimerase ao longo do processo de replicação e reparo da molécula de DNA (STUDART, 2001). Os microsatélites são flanqueados por

sequências de DNA, geralmente, conservadas dentro de uma mesma espécie, possibilitando o desenho de *primers* para amplificações específicas desses locos, via reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Microssatélites apresentam uma série de vantagens em comparação com outros marcadores moleculares (MELLO *et al.*, 2008). Estes marcadores diferenciam indivíduos homozigotos e heterozigotos (codominantes), identificam vários alelos simultaneamente (multialélicos) e possuem alta heterozigosidade (ZUCCHI, 2002). Além disso, os microssatélites possuem outras vantagens, como a alta reprodutibilidade, a simplicidade e a rapidez da técnica, demandam pequena quantidade de DNA e possuem grande poder de resolução (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A utilização de marcadores microssatélites contribui para o controle genético de características quantitativas complexas e permite a construção de mapas genéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Além disso, são considerados ideais para a estimação de parâmetros genéticos de populações e para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentescos. (ZUCCHI, 2002). Associar o uso de marcadores microssatélites com métodos tradicionais de melhoramento propicia o estabelecimento da seleção assistida por marcadores (SAM) superando as limitações da seleção fenotípica (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Visando analisar a contribuição dos marcadores microssatélites no melhoramento genético e apontar possíveis direções para o desenvolvimento de sua utilização, o objetivo deste trabalho foi verificar, por meio de publicações presentes na base de dados do periódico Capes, a razão de se avaliar os microssatélites nos principais organismos estudados.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo das diversas populações animais auxiliados por técnicas moleculares é de suma importância para a genética da conservação e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente quanto para auxiliar nos estudos de espécies ameaçadas de extinção.

Conhecer mais sobre os marcadores microssatélites utilizados, saber quais são os mais apropriados para cada tipo de estudo e se eles realmente trazem resultados confiáveis e satisfatórios é de suma importância para a genética

molecular e pode auxiliar no delineamento de novas pesquisas utilizando este tipo de marcador.

3 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente os trabalhos científicos, presentes na base de dados dos periódicos Capes que utilizaram marcadores microssatélites aplicados ao melhoramento genético.

3.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Verificar o total de publicações que utilizam microssatélites com aplicação no melhoramento genético nos últimos anos;
- b) Identificar os tipos de trabalho;
- c) Identificar os principais organismos estudados;
- d) Analisar o desenvolvimento do melhoramento genético por meio de marcadores moleculares.

4 METODOLOGIA

Neste trabalho, foi realizada uma análise bibliométrica das publicações que utilizaram marcadores microssatélites em estudos de melhoramento genético. Por meio dos dados coletados foi retratado o desenvolvimento dessa área.

Para o desenvolvimento deste levantamento bibliométrico, foi realizada uma pesquisa delimitada aos trabalhos encontrados no portal periódicos Capes, em abril de 2015, devida à sua abrangência quanto ao número de publicações e qualidade das revistas indexadas.

A estratégia para a busca no banco de dados foi a de utilizar as palavras-chave “Microssatélite” e “melhoramento genético”.

Foi feita uma triagem para identificar e retirar as publicações repetidas e aquelas que não se enquadraram nos parâmetros de interesse. Para que os trabalhos participem da amostra, os mesmos deveriam utilizar algum marcador do tipo microssatélite para resolver alguma questão relacionada ao melhoramento

genético. Além disso, foram considerados todos os trabalhos encontrados, independentemente do ano de publicação. Os trabalhos de revisão não fazem parte da amostra.

Os trabalhos encontrados foram lidos, tabulados e separados por ano de publicação, tipo de publicação, espécies estudadas e objetivos. Os resultados foram expressos em função de seu número relativo.

5 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Foram encontrados 33 trabalhos utilizando as palavras-chave “Melhoramento genético” e “Microssatélite”. Destes, apenas 27 publicações enquadraram-se na proposta da pesquisa e serviram como amostra para análise cienciométrica.

Quanto ao ano de publicação, foram encontrados trabalhos publicados desde 2002 até 2013. O maior volume de publicações ocorreu nos anos de 2008 e 2011, com sete e cinco artigos publicados, respectivamente (Figura 1). Nos últimos anos, os projetos genoma e o surgimento de novas metodologias de sequenciamento levaram a diminuição dos custos e o aumento expressivo do número de sequências depositadas nos bancos de dados de DNA (GenBank / NCBI), gerando oportunidades para a identificação de microssatélites, pela estratégia de exploração desse banco (Zane *et al.*, 2002). Além disso, as quedas bruscas no número de publicações entre um ano e outro provavelmente devem-se aos ciclos produtivos dos grupos de pesquisa, pois logo após essa queda há um aumento no número de artigos publicados no ano seguinte.

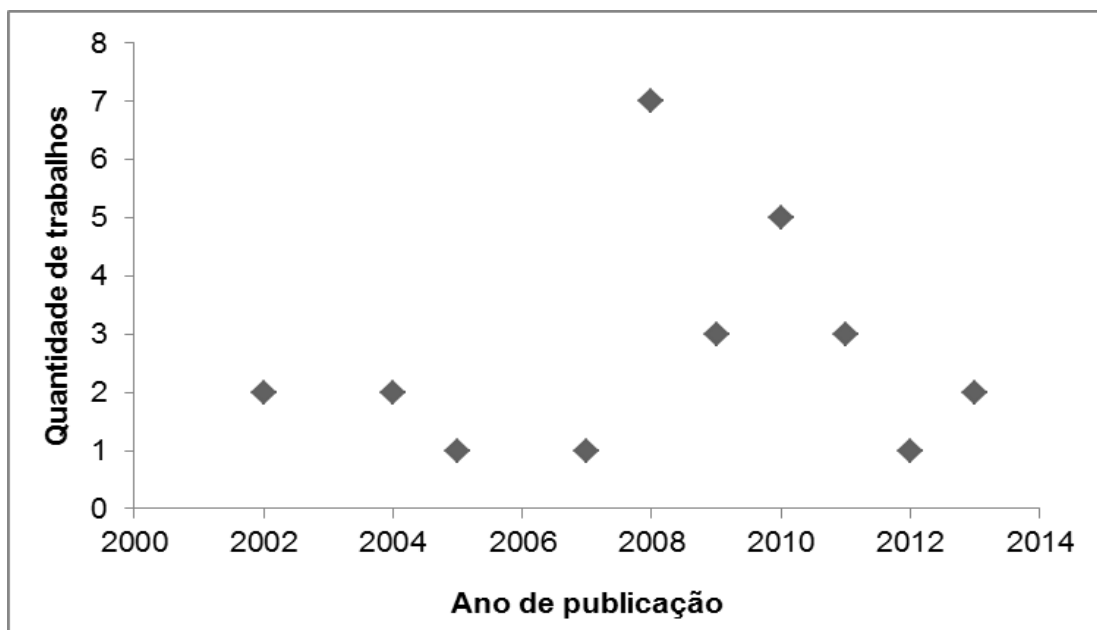


Gráfico 1: Quantidade de trabalhos científicos sobre melhoramento genético utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite publicados por ano.

E estes trabalhos foram apresentados das mais variadas formas, dentre os 27 trabalhos analisados, 37% (10) eram artigos, 26% (7) resumo, 22% (6) dissertação e 15% (4) tese (Figura 2). Considerando que os resumos, dissertações e tese, provavelmente, serão publicados em forma de artigo futuramente.

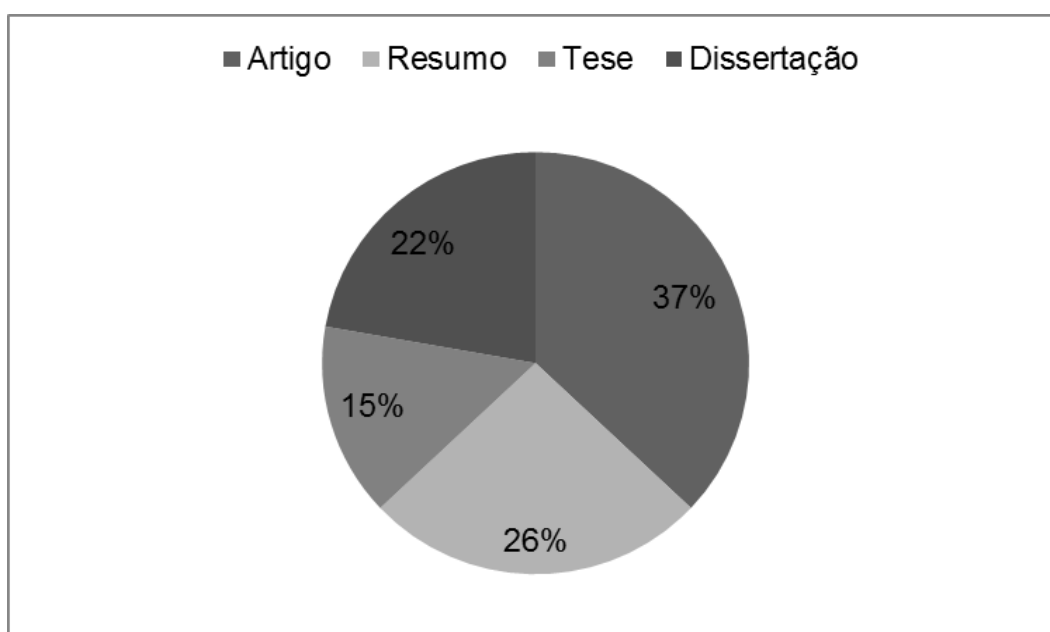


Gráfico 2: Frequência dos tipos trabalhos encontrados na busca no *periódicos capes* com as palavras-chave: "Melhoramento genético e "Microssatélite".

O melhoramento genético visa aumentar a frequência de alelos favoráveis em uma população animal ou vegetal. Dos trabalhos encontrados na busca no *periódicos Capes*, 74% (20) constituem melhoramento vegetal, 22% (6) melhoramento animal e um trabalho tinha como alvo fungos (Figura 3). Os microssatélites são os prediletos em estudos genéticos no melhoramento de plantas, devido à sua herança codominante e sua natureza multialélica (ZUCCHI, 2002). Além disso, os microssatélites possuem outras vantagens, como facilidade de detecção pela PCR e vasta cobertura do genoma (LI *et al.*, 2002), demandam pouca quantidade de DNA para dar início as reações (OLIVEIRA, 2006), possuem altas taxas de mutação e associação com regiões não repetitivas do genoma (MORGANTE *et al.*, 2002) sendo bastante úteis em estudos de diversidade genética de frutíferas (MARTINS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

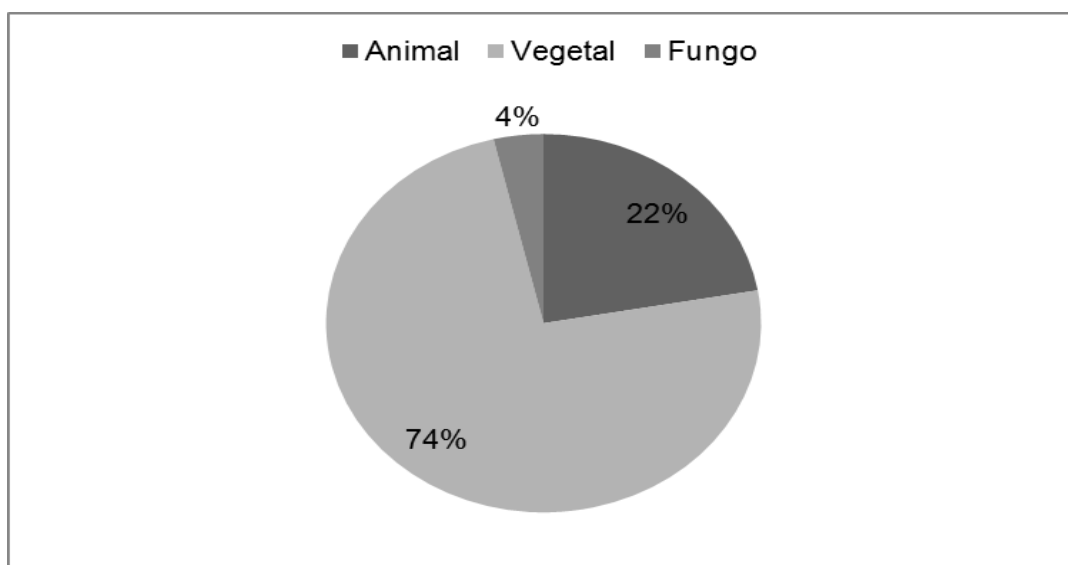


Gráfico 3: Frequência dos trabalhos de melhoramento utilizando marcadores microssatélite que estudaram vegetais, animais ou fungos.

Na Tabela 1 consta uma lista das espécies estudadas e o número trabalhos em que elas foram encontradas. A maioria das espécies foram estudadas em apenas um trabalho. Ao todo temos 21 espécies diferentes, o que indica a ampla aplicação e eficiência do marcador microssatélite. Marcadores microssatélites são os favoritos a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão dispersos ao acaso no genoma com uma alta frequência (AKKAYA *et al.*, 1992).

Tabela 1: Espécies de vegetais, animais e fungos estudados nos trabalhos de melhoramento de genético utilizando microssatélites e o número trabalhos com essas espécies

Espécie	Número de Trabalhos
Vegetais	
Abacate (<i>Parsea Americana</i>)	1
Arnica (<i>Lychnophora pinaster</i>)	1
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	2
Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	1
Cana de açúcar (<i>Puccinia melanocephala</i>)	1
Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>E. grandis</i> ; <i>E.urophylla</i> ; <i>E. globulus</i>)	1
Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>)	1
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	1
Leguminosa (<i>Arachis Pinto</i>)	1
Mamão (<i>Carica papaya</i>)	2
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	2
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	1
Milho (<i>Zea mays</i>)	2
Mirtilo (<i>Vaccinium ssp</i>)	1
Tangerina (<i>Citrus deliciosa</i>)	1
Urucum (<i>Bixa orellana</i>)	1
Animais	
Bovinos (<i>Bos taurus</i>)	2
Caprinos (<i>Ovis aries</i>)	2
Galinha (<i>Gallus spp.</i>)	1

Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	1
Fungos	
<i>Fungo (Fusarium solani)</i>	1
TOTAL	27

Em relação aos objetivos propostos, os trabalhos analisados de melhoramento genético utilizando marcadores microssatélites tinham vários objetivos, entre os principais, o estudo da variabilidade genética, a construção de mapas genéticos e a identificação e avaliação de genótipos (Tabela 2). E em praticamente todos, os marcadores microssatélites mostraram-se eficiente. Velame *et al* (2012) constataram a eficiência dos microssatélites, relatando que este marcador foi apropriado para separar os genótipos de mandioca, e com isso contribuirá com estudos posteriores sobre diversidade genética e direcionará estratégias a serem adotadas no programa de melhoramento. E Silva *et al* (2008), em estudo com mirtilos, apontaram que os microssatélites geraram resultados mais precisos em comparação ao RAPD, sendo mais recomendados para uso em programas de melhoramento e identificação de cultivares.

Tabela 2: Objetivos propostos pelos trabalhos encontrados na busca no banco de dados periódicos capes com as palavras-chave: “melhoramento genético” e “microssatélite”

Objetivos
Analisar a estrutura, a distância, e a “pureza” genética em raças raras e comerciais;
Aumentar a base genética das variedades comerciais;
Avaliar o estabelecimento de progênies;
Caracterização genética via marcador molecular microssatélite;
Caracterizar, avaliar e identificar genótipos utilizando marcadores microssatélites;
Comparar as distâncias multialélicas;
Construção de um mapa genético utilizando a marcadores microssatélite;

Desenvolver novas linhagens de arroz irrigado tolerantes ao herbicida imidazolinona;

Estudar a variabilidade genética;

Estudar polimorfismos genéticos;

Explorar a base de dados do GenBank / NCBI à procura de microssatélites de mamoeiro, visando o seu futuro uso em estudos genéticos e moleculares aplicados ao melhoramento genético;

Identificar precocemente indivíduos zigóticos em populações de citrus;

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O levantamento feito amostrou um numero pequeno de trabalhos, mas foi suficiente para constatar um aumento nas publicações de melhoramento genético que empregam marcadores moleculares microssatélites nos últimos anos. Verifica-se, também, que estas publicações incluem artigos, resumos, teses e dissertações, e são em sua maioria sobre melhoramento vegetal.

Os marcadores microssatélites foram empregados para uma ampla gama de espécies e com o intuito de atingir vários objetivos, indicando a eficiência e a aplicabilidade desse marcador.

Análises futuras considerando principalmente de artigos de bancos de dados internacionais podem revelar uma maior quantidade trabalhos.

REFERENCIAS

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soy bean. **Genetics**, v. 132, p.1131-1139, 1992.

BORÉM, A. **Glossário agrônomo**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Independente, 2006.

BUSO, G. S. C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

CHARLEWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryots. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

FERGUSON, A. *et al.* The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to Salmo. **J. Fish Biol.**, v. 47, p.103-126, 1995.

GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 47-50, 2013.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Biotecnologia**, p. 97-108, 2000.

LI, Y.C. *et al.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2456-2465, 2002.

MARTINS, A.B.G. *et al.* Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.4, p. 1178-1184, 2011.

MATIOLI, S. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: Matioli S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotechnol. Ciênc. Des.**, n. 5, p.14-17, 1998.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New york, v.30, p. 194-200, 2002.

OLIVEIRA, E. D. *et al.* Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados do DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 841-845, 2008.

OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: Desalle R.; Schierwater B. **Molecular Approaches to Ecology and Evolution**, Birkhäuser: Verlag Basel, 1998. p. 71-86.

SILVA, S.D.A. *et al.* Caracterização de genótipos de Mirtos utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, p. 180-184, 2008.

STUDART, M.T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP**. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

VELAME, D. R. *et al.* Uso de marcadores SSR no estudo da diversidade genética entre cultivares de mandioca. In: VI JORNADA CIENTÍFICA :EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 6., 2012, Bahia. **Anais...** Bahia: Embrapa, 2012..

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.1, p.1-16, 2002.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* D. utilizando marcadores RAPD e SSR.** 130f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.